

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

ANA LUIZA RIBEIRO FERNANDES

AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DE METABÓLITOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ISOLADAS DE ÉGUAS COM ENDOMETRITE

**Uberlândia – MG
2025**

ANA LUIZA RIBEIRO FERNANDES

AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DE METABÓLITOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ISOLADAS DE ÉGUAS COM ENDOMETRITE

Trabalho de Conclusão de Curso à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Reprodução Animal
Orientador: Prof. Dra. Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva

Uberlândia – MG

2025

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

| | |
|--|---|
| F363 | Fernandes, Ana Luiza Ribeiro, 2001- |
| 2025 | AVALIAÇÃO DO EFEITO IN VITRO DE METABÓLITOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ISOLADAS DE ÉGUAS COM ENDOMETRITE [recurso eletrônico] / Ana Luiza Ribeiro Fernandes. - 2025. |
| Orientadora: Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva. | |
| Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Medicina Veterinária. | |
| Modo de acesso: Internet. | |
| Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. | |
| I. Veterinária. I. Silva, Elisa Sant'Anna Monteiro da, 1985-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Medicina Veterinária. III. Título. | |
| CDU: 619 | |

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

ANA LUIZA RIBEIRO FERNANDES

AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DE METABÓLITOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ISOLADAS DE ÉGUAS COM ENDOMETRITE

Trabalho de Conclusão de Curso à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Reprodução Animal

Uberlândia, 22 de setembro de 2025.

Banca Examinadora:

Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva – Doutora (FMVZ-UFU)

Ricarda Maria dos Santos – Doutora (FMVZ-UFU)

Simone Sommerfeld – Doutora (FMVZ-UFU)

RESUMO

A endometrite bacteriana é muito comum em éguas e é a principal causa de subfertilidade na espécie. O uso irracional e excessivo de antibióticos como tratamento tem causado ampla resistência antimicrobiana. Assim, métodos alternativos de profilaxia e tratamento para esta afecção se tornam necessários e vêm sendo pesquisados, como a utilização de bactérias ácido-láticas como probióticos. O uso de *Lactobacillus* spp. vem ganhando destaque, visto que são microrganismos com capacidade de produção de metabólitos e supressão de patógenos presentes na endometrite equina. Este presente estudo testou a capacidade inibitória de diferentes cepas de *Lactobacillus* spp., sendo *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Lactiplantibacillus plantarum*, avaliando, *in vitro*, o efeito de seus metabólitos totais sobre microrganismos patogênicos encontrados no ambiente uterino de éguas com endometrite, tais quais *Pasteurella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus warneri*. Para tal, houve o cultivo e a formação dos spots das bactérias ácido-láticas, as quais foram inativadas posteriormente, restando seus metabólitos totais. Em seguida, após a adição das cepas patogênicas em meio de cultura para sua proliferação, foram inoculadas sobre as placas com os spots. Constatou-se os efeitos supressores, *in vitro*, das cepas probióticas sobre as patogênicas, a partir dos halos de inibição formados ao redor dos spots. Foi possível concluir que, dentre os *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus delbrueckii* apresentou maior inibição sobre *Pasteurella aerogenes* ($P<0,05$), *Lactobacillus acidophilus* sobre *Pseudomonas aeruginosa* ($P<0,05$) e que *Staphylococcus warneri* não sofreu nenhuma inibição de *Lactobacillus rhamnosus* GG, e sua inibição pelos demais não demonstrou diferença estatística ($P>0,05$). Com exceção da ausência de inibição de *Lactobacillus rhamnosus* GG sobre *Staphylococcus warneri*, todos os probióticos apresentaram médias de supressão no mínimo moderadas. *Pasteurella aerogenes* foi a bactéria patogênica mais inibida e *Staphylococcus warneri* a menos inibida. *Lactobacillus delbrueckii* teve capacidade inibitória com média muito forte para todas as bactérias patogênicas, sendo considerado o melhor probiótico. Estes resultados são promissores e reforçam a capacidade de supressão das bactérias ácido-láticas sobre as patogênicas, tornando seu uso uma possível alternativa aos tratamentos convencionais, o que minimiza a crescente resistência a antibióticos.

Palavras-chave: *Lactobacillus* spp.; resistência antimicrobiana; afecções reprodutivas; *Pasteurella aerogenes*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus warneri*.

ABSTRACT

Bacterial endometritis is very common in mares and is the main cause of subfertility in this species. The irrational and excessive use of antibiotics as treatment has led to widespread antimicrobial resistance. Therefore, alternative prophylaxis and treatment methods for this condition are necessary and are being researched, such as the use of lactic acid bacteria as probiotics. The use of *Lactobacillus* spp. has been gaining prominence, as these microorganisms can produce metabolites and suppressing pathogens present in equine endometritis. This study tested the inhibitory capacity of different strains of *Lactobacillus* spp., namely *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, and *Lactiplantibacillus plantarum*, evaluating, *in vitro*, the effect of their total metabolites on pathogenic microorganisms found in the uterine environment of mares with endometritis, such as *Pasteurella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus warneri*. To this end, lactic acid bacteria were cultivated and spots formed, which were subsequently inactivated, leaving their total metabolites. Then, after adding the pathogenic strains to the culture medium for their proliferation, they were inoculated onto the plates containing the spots. The *in vitro* suppressive effects of the probiotic strains on the pathogens were confirmed by the inhibition zones formed around the spots. It was concluded that, among the *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus delbrueckii* showed the greatest inhibition over *Pasteurella aerogenes* ($P<0.05$), *Lactobacillus acidophilus* over *Pseudomonas aeruginosa* ($P<0.05$), and that *Staphylococcus warneri* was not inhibited by *Lactobacillus rhamnosus* GG, and its inhibition by the others showed no statistical difference ($P>0.05$). Except for the absence of inhibition of *Lactobacillus rhamnosus* GG over *Staphylococcus warneri*, all probiotics showed at least moderate suppression means. *Pasteurella aerogenes* was the most inhibited pathogenic bacteria, and *Staphylococcus warneri* the least inhibited. *Lactobacillus delbrueckii* had a very strong inhibitory capacity for all pathogenic bacteria, being considered the best probiotic. These promising results reinforce the ability of lactic acid bacteria to suppress pathogenic bacteria, making their use a potential alternative to conventional treatments, minimizing growing antibiotic resistance.

Keywords: *Lactobacillus* spp.; antimicrobial resistance; reproductive disorders; *Pasteurella aerogenes*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus warneri*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL - Bactérias ácido-láticas

LA - *Lactobacillus acidophilus*

LADOC - Laboratório de Doenças Infectocontagiosas

LD - *Lactobacillus delbrueckii*

LGG - *Lactobacillus rhamnosus* GG

LP - *Lactiplantibacillus plantarum*

MRS - Man, Rogosa e Sharpe

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 9 |
| 2 | HIPÓTESE | 11 |
| 3 | OBJETIVOS | 12 |
| 4 | REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 4.1 | Endometrite Equina | 13 |
| 4.2 | Bactérias Patogênicas Associadas a Endometrite Equina | 14 |
| 4.3 | Bactérias Ácido-láticas | 14 |
| 4.4 | Teste de Inibição <i>In Vitro</i> com Bactérias Ácido-láticas | 15 |
| 5 | MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 5.1 | Bactérias Ácido-láticas e Bactérias Patogênicas | 17 |
| 5.2 | Teste de Inibição de Bactérias Patogênicas Usando <i>Lactobacillus</i> spp. | 17 |
| 5.3 | Análise Estatística | 19 |
| 6 | RESULTADOS | 20 |
| 7 | DISCUSSÃO | 23 |
| 8 | CONCLUSÃO | 26 |
| | REFERÊNCIAS | 27 |

1 INTRODUÇÃO

A equideocultura movimenta cerca de R\$ 30 bilhões no Brasil, o qual ocupa a quarta posição em número de animais no ranking mundial. Este setor tem um papel importante no agronegócio, com grande potencial econômico e social (Associação Brasileira de criadores de cavalo quarto de milha, 2022).

Algumas doenças causam grandes impactos econômicos na indústria de criação de equinos, como a endometrite, sendo esta a causa mais comum de subfertilidade em éguas, podendo, dentre outras, ter origem bacteriana, fúngica e persistente induzida pós-acasalamento. Nesse sentido, a doença causada por bactérias pode ter sua patogênese envolvida pela colonização do endométrio por microrganismos patogênicos, e seu diagnóstico, por vezes, é desafiador, visto que há uma variação na apresentação dos sinais clínicos entre os animais (Heil *et al.*, 2023).

É comum que os agentes infecciosos isolados na endometrite equina residam no microbioma normal da fêmea. Nesse contexto, as bactérias mais isoladas na doença são: *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Por fim, algumas cepas podem ser produtoras de biofilmes, o que colabora para casos crônicos e/ou sem resolução após vários tratamentos com antimicrobianos (Díaz-Bertrana *et al.*, 2021).

Convencionalmente, a endometrite pode ser tratada, dentre outros, com antimicrobianos, anti-inflamatórios e ecbólicos, mas com esta terapia tradicional tem-se a problemática do surgimento de patógenos resistentes (Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020). Dessa maneira, com uma baixa exposição aos antimicrobianos ou em níveis terapêuticos em tratamentos, os agentes bacterianos, tanto patogênicos quanto não patogênicos, podem desenvolver a resistência aos antibióticos, a qual, portanto, pode ser adquirida, mas também natural, sendo consequência, por exemplo, de mutações nos genes ou por pressão de seleção na natureza (Malaluang *et al.*, 2021). Tratamentos alternativos tornam-se necessários frente à resistência antimicrobiana, e o uso de bactérias para tal vem ganhando destaque, visto que algumas destas cepas têm capacidade de suprimir a proliferação de microrganismos patogênicas, por exemplo, pela produção de ácido láctico e proteína inibitória (Aroutcheva *et al.*, 2001).

Destarte, em estudo *in vitro*, foram observados efeitos antimicrobianos satisfatórios de bactérias ácido-láticas (BAL) de origens diversas, que não fossem do útero equino, sobre cepas patogênicas endometriais comumente isoladas de éguas com endometrite, além de cepas

isoladas de éguas saudáveis, em que a maioria é potencialmente maléfica e pode causar endometrite em um microbioma uterino com disbiose (Bernabe *et al.*, 2025).

2 HIPÓTESE

Esse estudo apresenta como hipótese que metabólitos produzidos por BAL são capazes de inibir, *in vitro*, o crescimento e a proliferação de bactérias patogênicas oriundas de éguas com endometrite.

3 OBJETIVOS

Os objetivos com o presente estudo foram testar a eficácia dos metabólitos de *Lactobacillus acidophilus* (LA), *Lactobacillus delbrueckii* (LD), *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) e *Lactiplantibacillus plantarum* (LP), *in vitro*, contra *Pasteurella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus warneri*, bactérias patogênicas isoladas da microbiota uterina de éguas com endometrite clínica.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Endometrite Equina

A endometrite é um processo inflamatório do endométrio, sendo a maior causa de infertilidade em éguas, a qual pode levar dentre outros problemas, à falha na concepção e morte do embrião (Amorim *et al.*, 2016). Pode ser classificada em crônica, quando a inflamação persiste por um longo período; aguda, com curso rápido e geralmente de intensidade elevada; subclínica, a qual não apresenta sinais clínicos mas pode afetar a fertilidade; persistente pós-cobertura, tendo reação inflamatória persistente à presença do sêmen; infecciosa, causada por agentes patogênicos como bactérias ou vírus; e venérea, em que a infecção ocorre por contato sexual, como monta, inseminação artificial ou procedimentos ginecológicos (Katila, 2016).

Os sinais clínicos variam de acordo com o agente etiológico e a cronicidade da doença, podendo alguns serem ausentes em casos subclínicos. Nesse viés, alguns exemplos são: fluído intrauterino, vaginite, corrimento vaginal, edema endometrial, cervicite e ciclos estrais anormais. Ademais, algumas bactérias, leveduras e fungos são responsáveis pela formação de biofilmes, o que pode resultar em infecções crônicas e persistentes (Amorim *et al.*, 2016).

De acordo com a predisposição ao desenvolvimento da patologia, as éguas são divididas em dois grupos, o de animais susceptíveis e o de resistentes. Assim, este primeiro inclui as fêmeas que têm propensão para desenvolver endometrite persistente, visto que não conseguem eliminar produtos inflamatórios e detritos, após o parto ou a monta, por exemplo, já o segundo grupo se refere aos animais que não tendem a desenvolver infecção uterina, conseguindo realizar uma devida purificação do útero (Troedsson; Liu; Thurmond, 1993).

Apesar de ser a causa mais comum de infertilidade, muitas éguas não conseguem ser diagnosticadas com a endometrite, ou quando são, requerem um manejo clínico reprodutivo maior, visto que os ciclos estrais podem ser irregulares ou há a necessidade de maior quantidade de ciclos para haver concepção, o que pode gerar um impacto econômico, visto que há um aumento nos custos para os proprietários (Amorim *et al.*, 2016).

Pode ser tratada, de forma tradicional, com lavagem uterina, medicamentos ecbólicos, anti-inflamatórios e antimicrobianos. Todavia, há a crescente prevalência de patógenos resistentes à terapia tradicional e/ou aos antimicrobianos, o que torna necessário o desenvolvimento de alternativas para tratar casos crônicos (Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020).

Com a crescente problemática de resistência antimicrobiana, tratamentos alternativos vêm sendo buscados, como a hemoterapia e o uso de ozônio, utilizados para bactérias e para fungos (Piatti; Mateus; Bacaro, 2023). Outra terapia não convencional que vem ganhando destaque é o uso de probióticos, tanto na medicina veterinária, quanto na medicina humana. Como exemplo, há os *Lactobacillus* spp., que têm capacidade de inibir o crescimento de bactérias causadoras de endometrite, por intermédio da produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio e proteína inibitória, por exemplo (Aroutcheva *et al.*, 2001).

4.2 Bactérias Patogênicas Associadas a Endometrite Equina

Dentre os principais patógenos associados à endometrite infecciosa, as bactérias mais frequentemente isoladas são *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Actinobacter* spp., *Proteus* spp. e *Citrobacter* spp. (Canisso; Stewart; Silva, 2016).

Um estudo conduzido por Virendra *et al.* (2024) realizou uma análise metagenômica para detectar as diferenças taxonômicas no microbioma uterino entre éguas saudáveis e com endometrite, constatando que, para as duas categorias, o reino das bactérias foi o mais abundante. Entretanto, no primeiro grupo, o principal filo foi o *Firmicutes*, seguido por *Proteobactérias*, e de forma oposta, no segundo grupo, *Proteobactérias* e, em sequência, *Firmicutes*. Ademais, essa mesma inversão ocorreu com a classe, sendo a de *Bacilos* a mais abundante em animais saudáveis e a de *Gammaproteobacteria* em animais com a inflamação. Por fim, *Brevibacillus brevis*, *Brevibacillus choshinensis* e *Paenibacillus sp* foram as espécies mais identificadas nas fêmeas que não apresentavam a patologia e, *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* e *Klebsiella pneumoniae*, as mais comuns nas doentes.

4.3 Bactérias Ácido-láticas

BAL são um grupo de microrganismos Gram-positivos que geralmente crescem sob condições microaerofílicas ou estritamente anaeróbicas e são catalase-negativas, em que compreendem uma grande diversidade de gêneros, tendo como mais importantes, por exemplo, *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. Além disso, possuem grande número de espécies, as quais podem ser encontradas em trato gastrointestinal tanto de animais quanto de humanos e em alimentos fermentados (Klein *et al.*, 1998).

De acordo com o produto da fermentação, as BAL são divididas em homofermentativas e heterofermentativas, sendo que as primeiras produzem ácido láctico como produto principal da fermentação da glucose, já as últimas produzem, além deste, etanol, ácido acético e dióxido de carbono (Carr; Chill; Maida, 2002).

A seleção de bactérias probióticas envolve a identificação de não patogênicas e de suas propriedades básicas, além da capacidade, por exemplo, de inibir cepas maléficas. Dessa maneira, apresentam, dentre outras, atividade imunorregulatória, gerando seus efeitos benéficos a partir de inibição de patógenos, restabelecimento da homeostase microbiana e modulação da imunidade (Freire *et al.*, 2021).

Algumas cepas de BAL usadas como probióticos, são geralmente dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*. Nesse âmbito, possuem características fisiológicas que reforçam o interesse no seu uso, tais como, resistência a pH baixo e a diferentes concentrações de NaCl, padrões de fermentação de carboidratos e capacidade de crescer em diferentes meios nutrientes (Klein *et al.*, 1998).

Um estudo realizado por Bernabe *et al.* (2025) testou, *in vitro*, a inibição de BAL sobre agentes patogênicos isolados do útero de éguas, tanto com endometrite clínica quanto saudáveis, e constatou resposta antimicrobiana satisfatória. O uso de probióticos, como os *Lactobacillus* spp., microrganismos que produzem ácido láctico e proteína inibitória, e têm capacidade de suprimir outras bactérias e manter o equilíbrio do microbioma uterino saudável, configura-se como um tratamento alternativo, podendo minimizar a resistência antimicrobiana (Aroutcheva *et al.*, 2001).

4.4 Teste de Inibição *In Vitro* com Bactérias Ácido-láticas

O teste de inibição *in vitro* em BAL consiste no cultivo de probióticos bacterianos, de forma isolada ou combinada, os quais produzem ácido láctico e outros compostos antimicrobianos, de modo que influenciam positivamente o ambiente uterino e suprimem patógenos nocivos. São feitos *spots* das bactérias probióticas em ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS - Kasvi®) e são incubadas em condições microaerofílicas, havendo seu crescimento em placas de Petri (Bernabe *et al.*, 2025).

A solução bacteriana patogênica é adicionada em ágar nutritivo e despejada sobre cada placa, as quais são incubadas. Concomitantemente, são testados dois grupos, o positivo, de bactérias patogênicas e, o negativo, sem bactérias. Assim, são medidos os diâmetros dos halos de inibição, podendo classificá-los de muito forte à nenhuma inibição (Bernabe *et al.*, 2025).

Gärtner *et al.* (2015) examinaram, *in vitro*, a capacidade de diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. de modular respostas inflamatórias em células epiteliais endometriais bovinas. Dentre as cepas testadas, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus ruminis* e *Lactobacillus amylovorus*, as duas últimas tiveram grande influência na síntese de fatores pró-inflamatórios. Além disso, *Lactobacillus buchneri* não demonstrou influência na expressão destes fatores. Constataram que todas as cepas examinadas não influenciaram negativamente a viabilidade das células uterinas co-cultivadas e que a presença destas bactérias estimula a imunomodulação sem gerar efeitos tóxicos nas células endometriais bovinas.

Bernabe *et al.* (2025) testaram efeitos antimicrobianos, *in vitro*, de metabólitos totais de LA e LP sobre bactérias patogênicas endometriais comuns de éguas e avaliaram a inibição desses metabólitos totais e de vesículas extracelulares contra *Escherichia coli* multirresistente de animais que apresentavam endometrite clínica. Destarte, constataram que os metabólitos totais de LA e/ou LP tiveram inibição efetiva contra *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Estreptococo equi*, *Actinobacillus equi* e *Klebsiella pneumoniae*, provenientes de éguas com e sem a endometrite clínica. Ademais, as vesículas extracelulares de LA podem inibir *Escherichia coli* multirresistente, o que, somados, configura o uso de LA e LP como uma alternativa para profilaxia e tratamento da patologia.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Bactérias Ácido-láticas e Bactérias Patogênicas

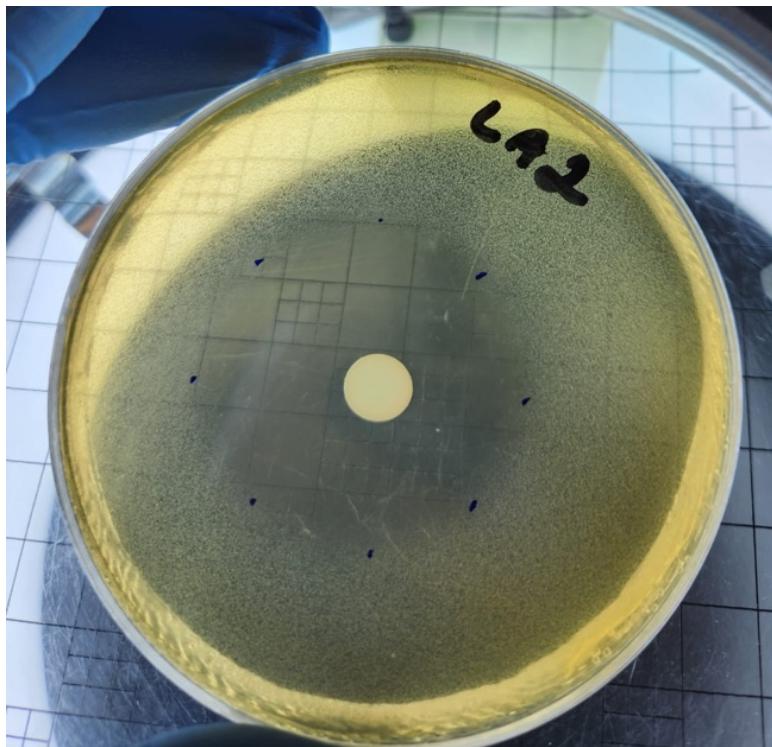
O estudo foi realizado no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (LADOC-UFU). Para avaliar o efeito, *in vitro*, foram testados quatro diferentes *Lactobacillus* spp., como cepas probióticas, sendo LA, LP, LGG e LD. As cepas patogênicas, previamente isoladas de éguas com endometrite clínica, foram *Pasteurella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus warneri*. Todas as cepas de bactérias foram armazenadas no banco de culturas do LADOC-UFU.

5.2 Teste de Inibição de Bactérias Patogênicas Usando *Lactobacillus* spp.

LA, LP, LGG e LD, cultivados isoladamente, foram diluídos em salina. Foram feitos os *spots* dos probióticos, colocando 5 μ L da diluição no centro da placa de Petri contendo ágar MRS, os quais foram incubados por 24 horas a 37° C, em condições microaerofílicas, visando seu crescimento. No dia seguinte, as BAL foram inativadas por intermédio de 1mL de vapor de clorofórmio, colocado na placa de Petri por cerca de 30 minutos, restando seus metabólitos totais. Após este período, com a abertura da placa, esta foi colocada em fluxo laminar, por 30 minutos, para haver a evaporação do clorofórmio residual. Em seguida, 10 μ L de solução das cepas patogênicas, com aproximadamente 10⁸ Unidades Formadoras de Colônias, foram adicionados em 10mL de ágar nutritivo líquido, os quais foram inoculados sobre cada placa das cepas probióticas, e estas foram para estufa, a 37° C, por 24 horas. Os metabólitos das BAL realizaram inibição sobre as bactérias patogênicas. Com isso, os diâmetros dos halos de inibição formados ao redor dos *spots* foram medidos e classificados: muito forte (> 20 mm de diâmetro), forte (15–19 mm), moderado (11–14 mm), fraco (9–10 mm) e nenhuma inibição (< 9 mm), de acordo com Reis *et al.* (2022).

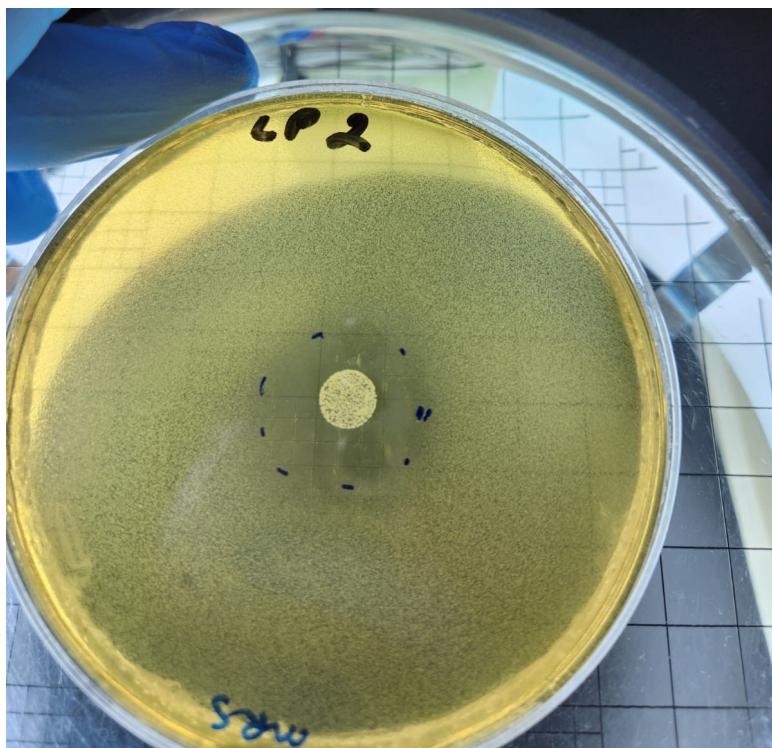
Exemplos de halos de inibição de LA e LP sobre *Pseudomonas aeruginosa* encontram-se, respectivamente, nas Imagens 1 e 2.

Imagen 1 – Halo de inibi o de LA sobre *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: Maria Clara Mendes Bernabe (2025)

Imagen 2 – Halo de inibi o de LP sobre *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: Maria Clara Mendes Bernabe (2025)

5.3 Análise Estatística

Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar o padrão da distribuição dos dados. Como os dados foram não paramétricos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações de postos médios (teste de Dunn), para comparar os efeitos dos diferentes *Lactobacillus* spp. sobre cada bactéria patogênica e o efeito de cada *Lactobacillus* spp. sobre as três bactérias patogênicas. As análises foram realizadas no R (R Core Team, 2025). Foi considerada diferença estatística quando $P < 0,05$.

6 RESULTADOS

As medianas dos resultados de inibição das diferentes BAL sobre *Pasteurella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus warneri* encontram-se, respectivamente, nos Gráficos 1, 2 e 3.

Dentre os quatro *Lactobacillus* spp., LD foi o que apresentou maior inibição sobre *Pasteurella aerogenes* ($P<0,05$). Sua inibição pelos demais, LA, LP e LGG, não apresentou diferença estatística ($P>0,05$) (Gráfico 1).

LA foi a cepa que inibiu mais fortemente *Pseudomonas aeruginosa* ($P<0,05$). A inibição de LD, LP e LGG não apresentou diferença estatística ($P>0,05$) (Gráfico 2).

Staphylococcus warneri não foi inibida por LGG. Sua inibição por LD, LA e LP, não obteve diferença estatística ($P>0,05$) (Gráfico 3).

Os resultados de inibição de cada *Lactobacillus* spp. sobre as três bactérias patogênicas testadas encontram-se na Figura 1.

LA teve maior inibição ($P<0,05$) sobre *Pasteurella aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*, sem diferença estatística entre as duas ($P>0,05$) (Figura 1A); LP inibiu mais fortemente *Pasteurella aerogenes* ($P<0,05$) (Figura 1B); LGG apresentou maior inibição sobre *Pasteurella aerogenes* ($P<0,05$) (Figura 1C); e LD inibiu mais *Pasteurella aerogenes ($P<0,05$) (Figura 1D).*

Gráfico 1 – Valores de inibição, em mediana, mais quartis superior e inferior, de *Lactobacillus acidophilus* (LA), *Lactobacillus delbrueckii* (LD), *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) e *Lactiplantibacillus plantarum* (LP) sobre *Pasteurella aerogenes*; letras diferentes representam diferença estatística ($P<0,05$)

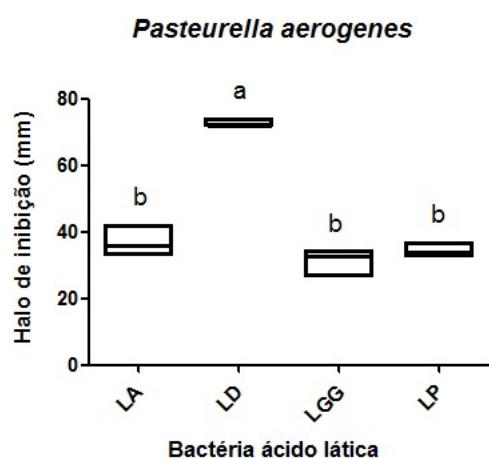


Gráfico 2 – Valores de inibição, em mediana, mais quartis superior e inferior, de *Lactobacillus acidophilus* (LA), *Lactobacillus delbrueckii* (LD), *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) e *Lactiplantibacillus plantarum* (LP) sobre *Pseudomonas aeruginosa*; letras diferentes representam diferença estatística ($P<0,05$)

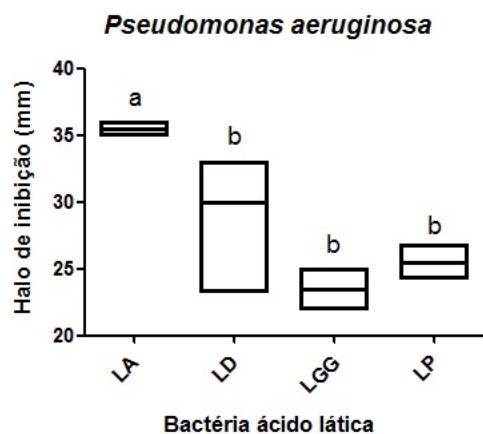


Gráfico 3 – Valores de inibição, em mediana, mais quartis superior e inferior, de *Lactobacillus acidophilus* (LA), *Lactobacillus delbrueckii* (LD), *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) e *Lactiplantibacillus plantarum* (LP) sobre *Staphylococcus warneri*; letras diferentes representam diferença estatística ($P<0,05$)

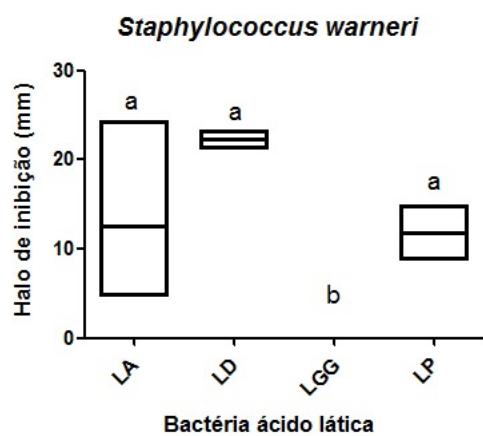
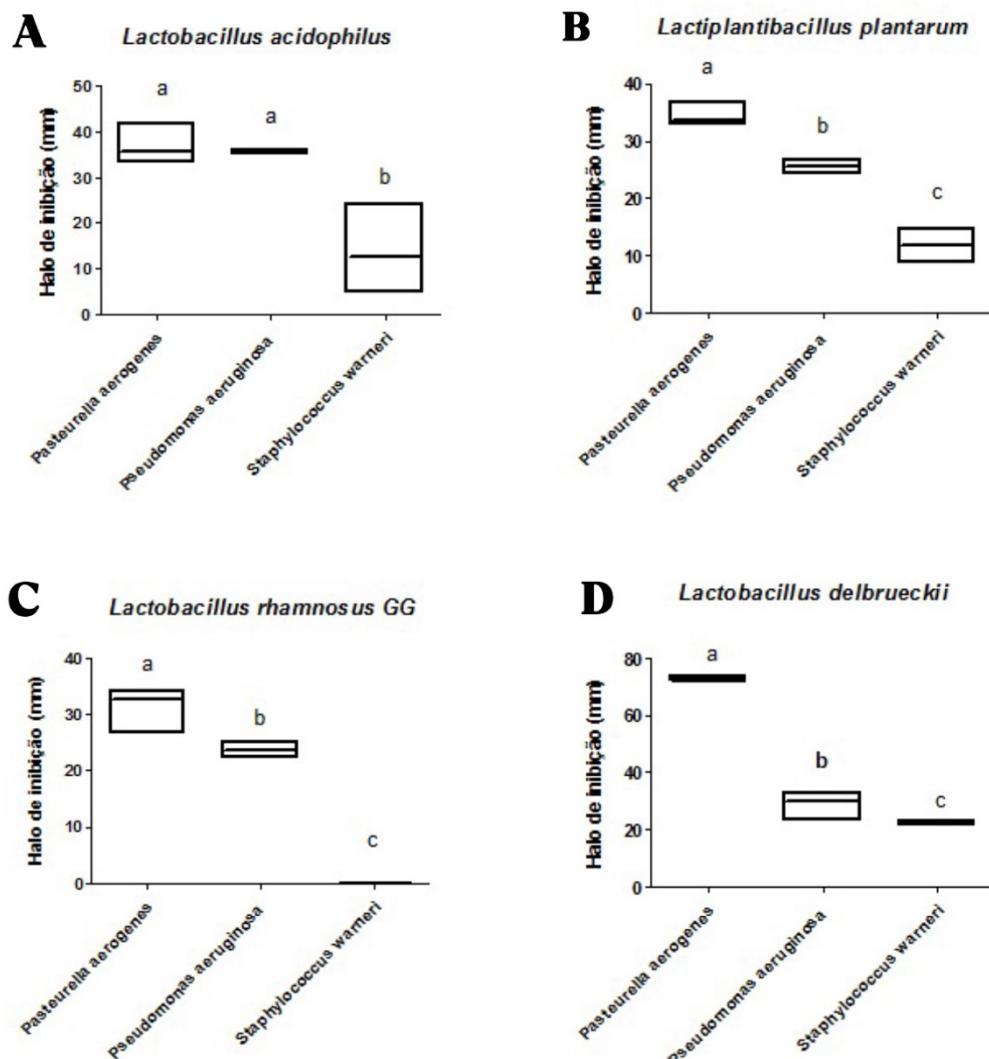


Figura 1 – Valores de inibição, em mediana, mais quartis superior e inferior, de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Lactobacillus delbrueckii*, sobre as três bactérias patogênicas, *Pasteurella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus warneri*; letras diferentes representam diferença estatística ($P<0,05$)



7 DISCUSSÃO

Os resultados deste presente estudo demonstraram que os *Lactobacillus* spp. são capazes de inibir, *in vitro*, bactérias patogênicas oriundas de éguas com endometrite.

Neste estudo, constatou-se que, *Pasteurella aerogenes* sofreu inibição de todas as BAL, mas foi mais suprimida por LD ($P<0,05$). *Pseudomonas aeruginosa* também foi inibida por todas as cepas probióticas, mas em maior grau por LA ($P<0,05$). *Staphylococcus warneri* foi inibida somente por LD, LA e LP, sem diferença estatística entre esses ($P>0,05$).

LA teve grande capacidade antimicrobiana contra *Pasteurella aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* ($P<0,05$), sem diferença estatística entre as duas ($P>0,05$); os diâmetros dos halos de inibição apresentaram médias com valores acima de 20 mm de diâmetro, sendo classificados como muito fortes. Os halos de inibição sobre *Staphylococcus warneri* obtiveram uma média de inibição considerada moderada.

LP apresentou maior inibição sobre *Pasteurella aerogenes* ($P<0,05$). Os halos de sua inibição sobre *Pasteurella aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram médias acima de 20 mm de diâmetro e, assim, ambos podem ser classificados como muito fortes. Os halos de inibição sobre *Staphylococcus warneri* obtiveram uma média de inibição considerada moderada.

LGG apresentou maior inibição sobre *Pasteurella aerogenes* ($P<0,05$), não realizando inibição sobre *Staphylococcus warneri*. Os halos de sua inibição sobre *Pasteurella aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram médias acima de 20 mm de diâmetro e, assim, ambos podem ser classificados como muito fortes.

LD apresentou maior inibição sobre *Pasteurella aerogenes* ($P<0,05$). Os halos de sua inibição sobre as três bactérias patogênicas, *Pasteurella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus warneri*, apresentaram médias acima de 20 mm de diâmetro e, assim, todos podem ser classificados como muito fortes.

Pasteurella aerogenes foi a bactéria patogênica mais inibida e *Staphylococcus warneri* a menos inibida. LD foi o melhor probiótico, dada sua capacidade de formar halos com médias de inibição muito fortes para todas as bactérias patogênicas testadas.

Dentre as bactérias patogênicas isoladas em éguas com endometrite, *Staphylococcus* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*, testadas neste estudo, estão entre as mais comuns (Langoni *et al.*, 1994). Além disso, há casos de septicemia neonatal em potros, em que a gênese do processo infeccioso ocorre ainda na vida uterina, sendo o gênero *Pasteurella* spp. um dos principais agentes isolados neste microbioma (Juffo, 2016).

Pesquisas recentes constataram que algumas bactérias probióticas, como os *Lactobacillus* spp., têm grande capacidade de produzir compostos antimicrobianos, os quais são os responsáveis pela supressão das cepas patogênicas oriundas de animais com endometrite e podem modular positivamente o ambiente uterino equino (Heikkilä; Saris, 2003).

Neste estudo, os *spots* das BAL foram formados ao centro das placas de Petri contendo ágar MRS, onde houve seu crescimento e a produção e difusão de seus metabólitos antimicrobianos. Posteriormente, visando a interrupção de seu crescimento, estas foram inativadas com vapor de clorofórmio, restando seus metabólitos produzidos, os quais demonstraram efeitos inibitórios sobre as cepas patogênicas testadas.

A supressão das BAL sobre as patogênicas, impediu sua proliferação, o que foi constatado pelo halo de inibição, formado ao redor do probiótico, local em que não houve o crescimento dos patógenos. O halo de inibição é formado ao redor do *spot* da BAL visto que é o local com maior concentração dos metabólitos totais; seu tamanho varia de acordo com a concentração e/ou difusão destes metabólitos.

Assim como neste estudo, uma pesquisa conduzida por Bernabe *et al.* (2025) avaliou, *in vitro*, os efeitos inibitórios de LA e LP sobre patógenos uterinos comumente isolados na endometrite equina, como *Escherichia coli*, *Estreptococo equi* e *Klebsiella pneumoniae*, em que foi constatada uma supressão efetiva dos seus metabólitos totais sobre estas bactérias maléficas.

Em outro estudo, realizado por Oliveira *et al.* (2024), em microbiota vaginal de mulheres, concluíram que dentre os *Lactobacillus* spp., o *Lactobacillus rhamnosus* é uma das espécies melhor utilizada como probiótico, com capacidade de restaurar a flora e o equilíbrio microbiano, reduzindo e prevenindo infecções, restaurando o pH vaginal e produzindo compostos antimicrobianos. Em uma pesquisa realizada por Jesus *et al.* (2022), LD também foi considerado como um bom probiótico, com características terapêuticas testadas *in vitro*, em que demonstrou capacidade para reverter danos inflamatórios, com propriedades imunoestimulatórias, de modo que algumas linhagens tiveram atividade antimicrobiana sobre bactérias patogênicas, por intermédio da produção de, por exemplo, ácidos orgânicos.

Vale ressaltar que o tratamento da endometrite equina é desafiador devido a diversos fatores, como infecções microbianas, microbioma uterino da égua, formação de biofilmes e uso excessivo de antibióticos (Köhne *et al.*, 2020). Com a iminente resistência aos antibióticos, cresce o uso dos probióticos na prevenção e tratamento da endometrite em éguas, dada sua capacidade de restaurar e manter o ambiente uterino saudável (Silva *et al.*, 2024).

É importante destacar que ainda há poucos estudos a respeito, mas o uso de BAL como probióticos vem ganhando destaque para afecções do trato reprodutivo. Desse modo, estes efeitos obtidos, *in vitro*, são promissores e levam a acreditar que o uso destas cepas pode ser uma alternativa eficaz para profilaxia e tratamento da endometrite equina, minimizando a resistência aos antibióticos. Assim, são necessárias mais pesquisas e a sua avaliação *in vivo*, objetivando comprovar tais efeitos supressores.

8 CONCLUSÃO

Avaliando os efeitos inibitórios, *in vitro*, dos metabólitos das BAL sobre as bactérias patogênicas isoladas de éguas com endometrite, percebe-se que *Pasteurella aerogenes* foi mais inibida por *Lactobacillus delbrueckii*, *Pseudomonas aeruginosa* por *Lactobacillus acidophilus* e *Staphylococcus warneri*, somente e sem diferença estatística, por *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactiplantibacillus plantarum*. *Lactobacillus acidophilus* realizou maior supressão sobre *Pasteurella aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*; *Lactobacillus rhamnosus GG* e *Lactiplantibacillus plantarum* tiveram médias de inibição muito fortes sobre *Pasteurella aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*; e *Lactobacillus delbrueckii* teve média de inibição muito forte para todas as bactérias patogênicas testadas. Portanto, *Pasteurella aerogenes* foi a bactéria patogênica mais suprimida por todas as BAL, enquanto *Staphylococcus warneri* a menos inibida, e *Lactobacillus delbrueckii* foi o melhor probiótico, visto que foi a única BAL que teve capacidade de inibir muito fortemente todas as cepas patogênicas.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, Mariana Diel *et al.* Comparison of clinical signs, endometrial culture, endometrial cytology, uterine low-volume lavage, and uterine biopsy and combinations in the diagnosis of equine endometritis. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s.l.], v. 44, p. 54-61, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080615006279>. Acesso em: 06 abr. 2025.
- AROUTCHEVA, Alla *et al.* Defense factors of vaginal lactobacilli. **American journal of obstetrics and gynecology**, [s.l.], v. 185, n. 2, p. 375-379, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0002937801772353>. Acesso em: 31 ago. 2025.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAVALO QUARTO DE MILHA.**
Estima-se que indústria do cavalo movimente cerca de R\$ 30 bilhões por ano no Brasil. [s.l.], 2022. Disponível em: <https://www.abqm.com.br/web/guest/w/estima-se-que-industria-do-cavalo-movimente-cerca-de-r-30-bilhoes-por-ano-no-brasil-1>. Acesso em: 14 abr. 2025.
- BERNABE, Maria Clara Mendes *et al.* Inibição de bactérias endometriais equinas por metabólitos e vesículas extracelulares de Lactobacillus acidophilus e lacticibacillus plantarum. **Veterinary Research Communications**, [s.l.], v. 49, n. 1, p. 61, 2025. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11259-024-10626-3>. Acesso em: 05 set. 2025.
- CANISSO, Igor F.; SEGABINAZZI, Lorenzo GTM; FEDORKA, Carleigh E. Endometrite persistente induzida por reprodução em éguas — Um desafio multifacetado: Dos aspectos clínicos à imunopatogênese e patobiologia. **International journal of molecular sciences**, [s.l.], v. 21, n. 4, p. 1432, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/4/1432>. Acesso em: 08 abr. 2025.
- CANISSO, Igor F.; STEWART, Jamie; SILVA, Marco A. Coutinho. Endometrite: Manejo da endometrite persistente pós-reprodução. **Clínicas Veterinárias: prática Equina**, [s.l.], v. 32, n. 3, p. 465-480, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27810036/>. Acesso em: 01 set. 2025.
- CARR, Frank J.; CHILL, Don; MAIDA, Nino. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical reviews in microbiology**, [s.l.], v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1040-840291046759>. Acesso em: 23 ago. 2025.
- DÍAZ-BERTRANA, María Luisa *et al.* Microbial prevalence and antimicrobial sensitivity in equine endometritis in field conditions. **Animals**, [s.l.], v. 11, n. 5, p. 1476, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/5/1476>. Acesso em: 10 abr. 2025.
- FREIRE, Thayná Thamires *et al.* Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. **Research, Society and Development**, [s.l.], v. 10, n. 11, p. e513101119964-e513101119964, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/19964>. Acesso em: 20 ago. 2025.
- GÄRTNER, Martina A. *et al.* Detecção e caracterização de Lactobacillus spp. no útero bovino e sua influência nas células epiteliais endometriais bovinas in vitro. **PLoS One**, [s.l.], v. 10, n.

3, p. e0119793, 2015. Disponível em:
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0119793>. Acesso em: 13 set. 2025.

HEIKKILÄ, Mari P.; SARIS, P. E. J. Inibição de *Staphylococcus aureus* pelas bactérias comensais do leite humano. **Revista de microbiologia aplicada**, [s.l.], v. 95, n. 3, pág. 471-478, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12911694/>. Acesso em: 14 set. 2025.

HEIL, B. A. *et al.* Efeito do método de amostragem na detecção do microbioma uterino equino durante o estro. **Ciências Veterinárias**, [s.l.], v. 10, n. 11, p. 644, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2306-7381/10/11/644>. Acesso em: 07 abr. 2025.

JESUS, Luís Cláudio Lima *et al.* **Probiogenômica de Lactobacillus delbrueckii CIDCA 133.** [S.l.], 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/items/c6bb0741-b473-47e3-a592-12ca59f44c50>. Acesso em: 02 set. 2025.

JUFFO, Gregory Duarte. Causas de aborto, natimortalidade e morte perinatal em equinos diagnosticadas no setor de Patologia Veterinária da UFRGS de 2000 a 2015. [s.l.], 2016. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/153240>. Acesso em: 08 set. 2025.

KATILA, Terttu. Avaliação de métodos diagnósticos em endometrite equina. **Reproductive Biology**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 189-196, 2016. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1642431X16300195?via%3Dihub>. Acesso em: 02 abr. 2025.

KLEIN, Günter *et al.* Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International journal of food microbiology**, [s.l.], v. 41, n. 2, p. 103-125, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016816059800049X>. Acesso em: 22 ago. 2025.

KÖHNE, Martin *et al.* Práticas de diagnóstico e tratamento da endometrite equina — um questionário. **Frontiers in veterinary science**, [s.l.], v. 7, p. 547, 2020. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7492380/>. Acesso em: 04 set. 2025.

LANGONI, H. *et al.* Estudo microbiológico e citológico do trato genital de éguas. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, [s.l.], p. 623-36, 1994. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-239898>. Acesso em: 10 set. 2025.

MALALUANG, Pongpreecha *et al.* Antimicrobial resistance in equine reproduction. **Animals**, [s.l.], v. 11, n. 11, p. 3035, 2021. Disponível em:
<https://www.mdpi.com/2076-2615/11/11/3035>. Acesso em: 11 abr. 2025.

OLIVEIRA, R. de C. *et al.* Microbiota vaginal e o uso de *Lactobacillus* como probiótico: evidências e controvérsias. **Contribuciones a las ciencias sociales**, [s.l.], v. 17, n. 10, p. e12148, 2024. Disponível em:
<https://ojs.revistacontribuciones.com/ojs/index.php/clcs/article/view/12148>. Acesso em: 10 set. 2025.

PIATTI, Alice T.; MATEUS, Heloisa B.; BACARO, Viviane Beatriz de G. Endometrite equina. **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, [s.l.], v. 9, pág. 26711–26724, 2023. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/63273>. Acesso em: 25 set. 2025.

REIS, Thais Fernanda Martins *et al.* Embriões de galinha são um modelo valioso para a seleção de *Bacillus subtilis* para fins probióticos. **Arquivos de Microbiologia**, [s.l.], v. 204, n. 12, p. 715, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-022-03307-9>. Acesso em: 24 set. 2025.

SILVA, Jessica Alejandra *et al.* Isolation of lactic acid bacteria from the reproductive tract of mares as potentially beneficial strains to prevent equine endometritis. **Veterinary research communications**, [s.l.], v. 48, n. 3, p. 1353-1366, 2024. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11259-024-10295-2>. Acesso em: 11 set. 2025.

TROEDSSON, Mats H. T; LIU, Irwin K. M; THURMOND, Mark. Função de neutrófilos polimorfonucleares uterinos e derivados do sangue em éguas suscetíveis e resistentes à infecção uterina crônica: fagocitose e quimiotaxia. **Biology of reproduction**, [s.l.], v. 49, n. 3, p. 507-514, 1993. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-abstract/49/3/507/2762384?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 13 abr. 2025.

VIRENDRA, Aeknath *et al.* Análise metagenômica revela novas diferenças taxonômicas no microbioma uterino entre éguas saudáveis e éguas com endometrite. **Medicina Veterinária e Ciência**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. e1369, 2024. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/vms3.1369>. Acesso em: 10 set. 2025.